



He 8

**PATENT**

Attorney Docket No.: 032301WD216

**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

Applicants: Brigitte BATHE, *et al.* )  
Serial No.: 09/942,935 ) Group Art Unit: Unassigned  
Filed: August 31, 2001 ) Examiner: Unassigned  
For: NUCLEOTIDE SEQUENCES WHICH CODE FOR THE sigM GENE

**CLAIM FOR FOREIGN PRIORITY**

Commissioner for Patents  
Washington, D.C. 20231

Dear Sir:

Under the provisions of Section 119 of 35 U.S.C., Applicants hereby claim the benefit of German Application No. DE 101 36 984.0 filed in Germany on July 28, 2001 relating to the above-identified United States patent application.

In support of Applicants' claim for priority, a certified copy of said German application is attached hereto.

Respectfully submitted,

SMITH, GAMBRELL & RUSSELL, LLP

By: 

Robert G. Weilacher, Reg. No. 20,531  
1850 M Street, N.W., Suite 800  
Washington, D.C. 20036  
Telephone: (202) 659-2811  
Facsimile: (202) 263-4329

November 6, 2001

# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:** 101 36 984.0

**Anmeldetag:** 28. Juli 2001

**Anmelder/Inhaber:** Degussa AG, Düsseldorf/DE

**Bezeichnung:** Für das sigM-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

**Priorität:** 2.9.2000 DE 100 43 337.5

**IPC:** C 12 N, C 07 H, C 12 P

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 16. Oktober 2001  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

Hoia

**Für das sigM-Gen kodierende Nukleotidsequenzen**

Gegenstand der Erfindung sind für das sigM-Gen kodierende Nukleotidsequenzen aus coryneformen Bakterien und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren 5 unter Verwendung von Bakterien, in denen das endogene sigM-Gen verstärkt wird.

**Stand der Technik**

L-Aminosäuren, insbesondere Lysin, finden in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, in der 10 Lebensmittelindustrie und ganz besonders in der Tierernährung, Anwendung.

Es ist bekannt, dass Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien, insbesondere Corynebacterium glutamicum, hergestellt werden. Wegen der 15 großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen wie zum Beispiel Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien wie zum Beispiel die 20 Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform durch zum Beispiel Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

25 Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite oder auxotroph für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und 30 Aminosäuren produzieren.

Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung von L-Aminosäure produzierenden Stämmen von Corynebacterium

eingesetzt, indem man einzelne Aminosäure-Biosynthesegene amplifiziert und die Auswirkung auf die Aminosäure-Produktion untersucht.

#### Aufgabe der Erfindung

5 Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von Aminosäuren bereitzustellen.

#### Beschreibung der Erfindung

Werden im folgenden L-Aminosäuren oder Aminosäuren erwähnt,

10 sind damit eine oder mehrere Aminosäuren einschließlich ihrer Salze, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan  
15 und L-Arginin gemeint. Besonders bevorzugt ist Lysin.

Wenn im folgenden L-Lysin oder Lysin erwähnt werden, sind damit nicht nur die Basen, sondern auch die Salze wie z.B. Lysin-Monohydrochlorid oder Lysin-Sulfat gemeint.

20 Gegenstand der Erfindung ist ein isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine für das sigM-Gen kodierende Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

25 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,

30 b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,

30 c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und

d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),

wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität des Sigma-5 Faktors M aufweist.

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls das oben genannte Polynukleotid, wobei es sich bevorzugt um eine replizierbare DNA handelt, enthaltend:

(i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1,  
10 oder

(ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Kodes entspricht, oder

15 (iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert, und gegebenenfalls

(iv) funktionsneutralen Sinnmutationen in (i).

Weitere Gegenstände sind

20 ein replizierbares Polynukleotid, insbesondere DNA, enthaltend die Nukleotidsequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt;

ein Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID No. 2 dargestellt, enthält;

25 ein Vektor, enthaltend das erfindungsgemäße Polynukleotid, insbesondere Pendelvektor oder Plasmidvektor, und coryneforme Bakterien, die den Vektor enthalten oder in denen das endogene sigM-Gen verstärkt ist.

Gegenstand der Erfindung sind ebenso Polynukleotide, die im wesentlichen aus einer Polynukleotidsequenz bestehen, die erhältlich sind durch Screening mittels Hybridisierung einer entsprechenden Genbank eines coryneformen Bakteriums,

5 die das vollständige Gen oder Teile davon enthält, mit einer Sonde, die die Sequenz des erfindungsgemäßen Polynukleotids gemäß SEQ ID No.1 oder ein Fragment davon enthält und Isolierung der genannten Polynukleotidsequenz.

Polynukleotide, die die Sequenzen gemäß der Erfindung

10 enthalten, sind als Hybridisierungs-Sonden für RNA, cDNA und DNA geeignet, um Nukleinsäuren beziehungsweise Polynukleotide oder Gene in voller Länge zu isolieren, die für den Sigma-Faktor M kodieren, oder um solche Nukleinsäuren beziehungsweise Polynukleotide oder Gene zu

15 isolieren, die eine hohe Ähnlichkeit der Sequenz mit der des sigM-Gens aufweisen. Sie sind ebenso zum Einbau in sogenannte „arrays“, „micro arrays“ oder „DNA chips“ geeignet, um die entsprechenden Polynukleotide zu detektieren und zu bestimmen.

20 Polynukleotide, die die Sequenzen gemäß der Erfindung enthalten, sind weiterhin als Primer geeignet, mit deren Hilfe mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) DNA von Genen hergestellt werden kann, die für den Sigma-Faktor M kodieren.

25 Solche als Sonden oder Primer dienende Oligonukleotide, enthalten mindestens 25, 26, 27, 28, 29 oder 30, bevorzugt mindestens 20, 21, 22, 23 oder 24, ganz besonders bevorzugt mindestens 15, 16, 17, 18 oder 19 aufeinanderfolgende Nukleotide. Geeignet sind ebenfalls Oligonukleotide mit

30 einer Länge von mindestens 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 oder 40, oder mindestens 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 oder 50 Nukleotiden. Gegebenenfalls sind auch Oligonukleotide mit einer Länge von mindestens 100, 150, 200, 250 oder 300 Nukleotiden geeignet.

„Isoliert“ bedeutet aus seinem natürlichen Umfeld herausgetrennt.

„Polynukleotid“ bezieht sich im allgemeinen auf Polyribonukleotide und Polydeoxyribonukleotide, wobei es 5 sich um nicht modifizierte RNA oder DNA oder modifizierte RNA oder DNA handeln kann.

Die Polynukleotide gemäß Erfindung schließen ein Polynukleotid gemäß SEQ ID No. 1 oder ein daraus hergestelltes Fragment und auch solche ein, die zu 10 wenigstens besonders 70% bis 80%, bevorzugt zu wenigstens 81% bis 85%, besonders bevorzugt zu wenigstens 86% bis 90%, und ganz besonders bevorzugt zu wenigstens 91%, 93%, 95%, 97% oder 99% identisch sind mit dem Polynukleotid gemäß SEQ ID No. 1 oder eines daraus hergestellten Fragmentes.

15 Unter „Polypeptiden“ versteht man Peptide oder Proteine, die zwei oder mehr über Peptidbindungen verbundene Aminosäuren enthalten.

Die Polypeptide gemäß Erfindung schließen ein Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2, insbesondere solche mit der 20 biologischen Aktivität des Sigma-Faktors M und auch solche ein, die zu wenigstens 70% bis 80%, bevorzugt zu wenigstens 81% bis 85%, besonders bevorzugt zu wenigstens 86% bis 90%, und ganz besonders bevorzugt zu wenigstens 91%, 93%, 95%, 97% oder 99% identisch sind mit dem Polypeptid gemäß SEQ ID 25 No. 2 und die genannte Aktivität aufweisen.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-30 Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan und L-Arginin, unter Verwendung von coryneformen Bakterien, die insbesondere bereits Aminosäuren produzieren und in denen die für das sigM-Gen

kodierenden Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

Der Begriff "Verstärkung" beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme (Proteine) in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene erhöht, einen starken Promotor verwendet oder ein Gen oder Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym (Protein) mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Durch die Maßnahmen der Verstärkung, insbesondere Überexpression, wird die Aktivität oder Konzentration des entsprechenden Proteins im allgemeinen um mindestens 10%, 15% 25%, 50%, 75%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400% oder 500%, maximal bis 1000% oder 2000% bezogen auf die des Wildtyp-Proteins beziehungsweise der Aktivität oder Konzentration des Proteins im Ausgangs-Mikroorganismus erhöht.

Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können L-Aminosäuren aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es kann sich um Vertreter coryneformer Bakterien insbesondere der Gattung *Corynebacterium* handeln. Bei der Gattung *Corynebacterium* ist insbesondere die Art *Corynebacterium glutamicum* zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist, L-Aminosäuren zu produzieren.

Geeignete Stämme der Gattung *Corynebacterium*, insbesondere der Art *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*), sind besonders die bekannten Wildtypstämme

*Corynebacterium glutamicum* ATCC13032

*Corynebacterium acetoglutamicum* ATCC15806

*Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC13870

Corynebacterium thermoaminogenes FERM BP-1539

Corynebacterium melassecola ATCC17965

Brevibacterium flavum ATCC14067

Brevibacterium lactofermentum ATCC13869 und

5

Brevibacterium divaricatum ATCC14020

und daraus hergestellte L-Aminosäuren produzierende Mutanten bzw. Stämme.

Das neue, für das Enzym Sigma-Faktor M kodierende sigM-Gen von *C. glutamicum* wurde isoliert.

10 Zur Isolierung des sigM-Gens oder auch anderer Gene von *C. glutamicum* wird zunächst eine Genbank dieses Mikroorganismus in *Escherichia coli* (*E. coli*) angelegt. Das Anlegen von Genbanken ist in allgemein bekannten Lehrbüchern und Handbüchern niedergeschrieben. Als Beispiel 15 seien das Lehrbuch von Winnacker: Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland, 1990), oder das Handbuch von Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) genannt. Eine sehr bekannte Genbank 20 ist die des *E. coli* K-12 Stammes W3110, die von Kohara et al. (Cell 50, 495-508 (1987)) in  $\lambda$ -Vektoren angelegt wurde. Bathe et al. (Molecular and General Genetics, 252:255-265, 1996) beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum* ATCC13032, 25 die mit Hilfe des Cosmidvektors SuperCos I (Wahl et al., 1987, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 84:2160-2164) im *E. coli* K-12 Stamm NM554 (Raleigh et al., 1988, Nucleic Acids Research 16:1563-1575) angelegt wurde.

Börmann et al. (Molecular Microbiology 6(3), 317-326) 30 wiederum beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum* ATCC13032 unter Verwendung des Cosmids pHC79 (Hohn und Collins, Gene 11, 291-298 (1980)).

Zur Herstellung einer Genbank von *C. glutamicum* in *E. coli* können auch Plasmide wie pBR322 (Bolivar, Life Sciences,

25, 807-818 (1979)) oder pUC9 (Vieira et al., 1982, Gene, 19:259-268) verwendet werden. Als Wirsche eignen sich besonders solche *E. coli* Stämme, die restriktions- und rekombinationsdefekt sind. Ein Beispiel hierfür ist der 5 Stamm DH5αmcr, der von Grant et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 87 (1990) 4645-4649) beschrieben wurde. Die mit Hilfe von Cosmiden klonierten langen DNA-Fragmente können anschließend wiederum in gängige, für die Sequenzierung geeignete Vektoren 10 subkloniert und anschließend sequenziert werden, so wie es z.B. bei Sanger et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 74:5463-5467, 1977) beschrieben ist.

Die erhaltenen DNA-Sequenzen können dann mit bekannten 15 Algorithmen bzw. Sequenzanalyse-Programmen wie z.B. dem von Staden (Nucleic Acids Research 14, 217-232(1986)), dem von Marck (Nucleic Acids Research 16, 1829-1836 (1988)) oder dem GCG-Programm von Butler (Methods of Biochemical Analysis 39, 74-97 (1998)) untersucht werden.

20 Die neue für das Gen sigM kodierende DNA-Sequenz von *C. glutamicum* wurde erhalten, die als SEQ ID No. 1 Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. Weiterhin wurde aus der vorliegenden DNA-Sequenz mit den oben beschriebenen Methoden die Aminosäuresequenz des entsprechenden Proteins 25 abgeleitet. In SEQ ID No. 2 ist die sich ergebende Aminosäuresequenz des sigM-Genproduktes dargestellt. Es ist bekannt, daß wirtseigene Enzyme die N-terminale Aminosäure Methionin bzw. Formylmethionin des gebildeten Proteins abspalten können.

30 Kodierende DNA-Sequenzen, die sich aus SEQ ID No. 1 durch die Degeneriertheit des genetischen Kodes ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung. In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren, Bestandteil der Erfindung. In der 35 Fachwelt sind weiterhin konservative Aminosäureaustausche

wie z.B. Austausch von Glycin gegen Alanin oder von Asparaginsäure gegen Glutaminsäure in Proteinen als „Sinnmutationen“ (sense mutations) bekannt, die zu keiner grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des Proteins

5 führen, d.h. funktionsneutral sind. Derartige Mutationen werden unter anderem auch als neutrale Substitutionen bezeichnet. Weiterhin ist bekannt, daß Änderungen am N- und/oder C-Terminus eines Proteins dessen Funktion nicht wesentlich beeinträchtigen oder sogar stabilisieren können.

10 Angaben hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Ben-Bassat et al. (Journal of Bacteriology 169:751-757 (1987)), bei O'Regan et al. (Gene 77:237-251 (1989)), bei Sahin-Toth et al. (Protein Sciences 3:240-247 (1994)), bei Hochuli et al. (Bio/Technology 6:1321-1325 (1988)) und in bekannten

15 Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie. Aminosäuresequenzen, die sich in entsprechender Weise aus SEQ ID No. 2 ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung.

In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1

20 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren Bestandteil der Erfindung. Schließlich sind DNA-Sequenzen Bestandteil der Erfindung, die durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung von Primern hergestellt werden, die sich aus SEQ ID No. 1 ergeben. Derartige Oligonukleotide haben

25 typischerweise eine Länge von mindestens 15 Nukleotiden.

Anleitungen zur Identifizierung von DNA-Sequenzen mittels Hybridisierung findet der Fachmann unter anderem im Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH

30 (Mannheim, Deutschland, 1993) und bei Liebl et al. (International Journal of Systematic Bacteriology (1991) 41: 255-260). Die Hybridisierung findet unter stringenten Bedingungen statt, das heisst, es werden nur Hybride gebildet, bei denen Sonde und Zielsequenz, d. h. die mit

35 der Sonde behandelten Polynukleotide, mindestens 70%

identisch sind. Es ist bekannt, dass die Stringenz der Hybridisierung einschließlich der Waschschritte durch Variieren der Pufferzusammensetzung, der Temperatur und der Salzkonzentration beeinflußt bzw. bestimmt wird. Die 5 Hybridisierungsreaktion wird vorzugsweise bei relativ niedriger Stringenz im Vergleich zu den Waschschritten durchgeführt (Hybaid Hybridisation Guide, Hybaid Limited, Teddington, UK, 1996).

Für die Hybridisierungsreaktion kann beispielsweise ein 5x 10 SSC-Puffer bei einer Temperatur von ca. 50 - 68°C eingesetzt werden. Dabei können Sonden auch mit Polynukleotiden hybridisieren, die weniger als 70% Identität zur Sequenz der Sonde aufweisen. Solche Hybride sind weniger stabil und werden durch Waschen unter 15 stringenten Bedingungen entfernt. Dies kann beispielsweise durch Senken der Salzkonzentration auf 2x SSC und gegebenenfalls nachfolgend 0,5x SSC (The DIG System User's Guide for Filter Hybridisation, Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland, 1995) erreicht werden, wobei eine 20 Temperatur von ca. 50 - 68°C eingestellt wird. Es ist gegebenenfalls möglich die Salzkonzentration bis auf 0,1x SSC zu senken. Durch schrittweise Erhöhung der Hybridisierungstemperatur in Schritten von ca. 1 - 2°C von 25 50 auf 68°C können Polynukleotidfragmente isoliert werden, die beispielsweise mindestens 70% oder mindestens 80% oder mindestens 90% bis 95% Identität zur Sequenz der eingesetzten Sonde besitzen. Weitere Anleitungen zur Hybridisierung sind in Form sogenannter Kits am Markt erhältlich (z.B. DIG Easy Hyb von der Firma Roche 30 Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Catalog No. 1603558).

Anleitungen zur Amplifikation von DNA-Sequenzen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) findet der Fachmann unter anderem im Handbuch von Gait: Oligonucleotide 35 Synthesis: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, UK,

1984) und bei Newton und Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994).

Es wurde gefunden, daß coryneforme Bakterien nach Überexpression des sigM-Gens in verbesserter Weise

5 Aminosäuren produzieren.

Zur Erzielung einer Überexpression kann die Kopienzahl der entsprechenden Gene erhöht werden, oder es kann die Promotor- und Regulationsregion oder die Ribosomenbindungsstelle, die sich stromaufwärts des

10 Strukturgens befindet, mutiert werden. In gleicher Weise wirken Expressionskassetten, die stromaufwärts des Strukturgens eingebaut werden. Durch induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich, die Expression im Verlaufe der fermentativen Aminosäure-Produktion zu

15 steigern. Durch Maßnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer der m-RNA wird ebenfalls die Expression verbessert.

Weiterhin wird durch Verhinderung des Abbaus des Enzymproteins ebenfalls die Enzymaktivität verstärkt. Die Gene oder Genkonstrukte können entweder in Plasmiden mit

20 unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen oder im Chromosom integriert und amplifiziert sein. Alternativ kann weiterhin eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden.

25 Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Martin et al. (Bio/Technology 5, 137-146 (1987)), bei Guerrero et al. (Gene 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya und Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988)), bei Eikmanns et al. (Gene 102, 93-98 (1991)), in der Europäischen

30 Patentschrift 0 472 869, im US Patent 4,601,893, bei Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)), bei Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)), bei LaBarre et al. (Journal of Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)), in der Patentanmeldung 35 WO 96/15246, bei Malumbres et al. (Gene 134, 15 - 24

(1993)), in der japanischen Offenlegungsschrift JP-A-10-229891, bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195 (1998)), bei Makrides (Microbiological Reviews 60:512-538 (1996)) und in 5 bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.

Zur Verstärkung wurde das erfindungsgemäße sigM-Gen beispielhaft mit Hilfe von episomalen Plasmiden überexprimiert. Als Plasmide eignen sich solche, die in coryneformen Bakterien repliziert werden. Zahlreiche 10 bekannte Plasmidvektoren wie z.B. pZ1 (Menkel et al., Applied and Environmental Microbiology (1989) 64: 549-554), pEKEx1 (Eikmanns et al., Gene 102:93-98 (1991)) oder pHS2-1 (Sonnen et al., Gene 107:69-74 (1991)) beruhen auf den kryptischen Plasmiden pHM1519, pBL1 oder pGA1. Andere

15 Plasmidvektoren wie z.B. solche, die auf pCG4 (US-A 4,489,160), oder pNG2 (Serwold-Davis et al., FEMS Microbiology Letters 66, 119-124 (1990)), oder pAG1 (US-A 5,158,891) beruhen, können in gleicher Weise verwendet werden.

20 Weiterhin eignen sich auch solche Plasmidvektoren mit Hilfe derer man das Verfahren der Genamplifikation durch Integration in das Chromosom anwenden kann, so wie es beispielsweise von Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)) zur

25 Duplikation bzw. Amplifikation des hom-thrB-Operons beschrieben wurde. Bei dieser Methode wird das vollständige Gen in einen Plasmidvektor kloniert, der in einem Wirt (typischerweise E. coli), nicht aber in C. glutamicum replizieren kann. Als Vektoren kommen beispielsweise

30 pSUP301 (Simon et al., Bio/Technology 1, 784-791 (1983)), pK18mob oder pK19mob (Schäfer et al., Gene 145, 69-73 (1994)), pGEM-T (Promega Corporation, Madison, WI, USA), pCR2.1-TOPO (Shuman (1994)). Journal of Biological Chemistry 269:32678-84; US-A 5,487,993), pCR®Blunt (Firma

35 Invitrogen, Groningen, Niederlande; Bernard et al., Journal

of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)), pEM1 (Schrumpf et al, 1991, Journal of Bacteriology 173:4510-4516) oder pBGS8 (Spratt et al., 1986, Gene 41: 337-342) in Frage. Der Plasmidvektor, der das zu amplifizierende Gen enthält, wird 5 anschließend durch Konjugation oder Transformation in den gewünschten Stamm von *C. glutamicum* überführt. Die Methode der Konjugation ist beispielsweise bei Schäfer et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 756-759 (1994)) beschrieben. Methoden zur Transformation sind 10 beispielsweise bei Thierbach et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988)), Dunican und Shivnan (Bio/Technology 7, 1067-1070 (1989)) und Tauch et al. (FEMS Microbiological Letters 123, 343-347 (1994)) beschrieben. Nach homologer Rekombination mittels eines "cross over"- 15 Ereignisses enthält der resultierende Stamm mindestens zwei Kopien des betreffenden Gens.

Zusätzlich kann es für die Produktion von L-Aminosäuren vorteilhaft sein, neben dem sigM-Gen eines oder mehrere Enzyme des jeweiligen Biosyntheseweges, der Glykolyse, der 20 Anaplerotik, des Zitronensäure-Zyklus, des Pentosephosphatzzyklus, des Aminosäure-Exports und gegebenenfalls regulatorische Proteine zu verstärken, insbesondere überzuexprimieren.

So kann beispielsweise für die Herstellung von L- 25 Aminosäuren zusätzlich zur Verstärkung des endogenen sigM- Gens eines oder mehrere Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Dihydripicolinat-Synthase kodierende Gen dapA (EP-B 0 197 335),
- das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase 30 kodierende Gen gap (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die Triosephosphat Isomerase kodierende Gen tpi (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),

- das für die 3-Phosphoglycerat Kinase kodierende Gen pgk (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase kodierende Gen zwf (JP-A-09224661),

5     • das für die Pyruvat Carboxylase kodierende Gen pyc (DE-A-198 31 609),

- das für die Malat-Chinon-Oxidoreduktase kodierende Gen mqo (Molenaar et al., European Journal of Biochemistry 254, 395-403 (1998)),

10    • das für eine feed-back resistente Aspartatkinase kodierende Gen lysC (Accession No.P26512; EP-B-0387527; EP-A-0699759),

- das für den Lysin-Export kodierende Gen lysE (DE-A-195 48 222),

15    • das für die Homoserin-Dehydrogenase kodierende Gen hom (EP-A 0131171),

- das für die Threonin-Dehydratase kodierende Gen ilvA (Möckel et al., Journal of Bacteriology (1992) 8065-8072) oder das für eine "feed back resistente" Threonin-Dehydratase kodierende Allel ilvA(Fbr) (Möckel et al., (1994) Molecular Microbiology 13: 833-842),

20    • das für die Acetohydroxysäure-Synthase kodierenden Gen ilvBN (EP-B 0356739),

- das für die Dihydroxysäuredehydratase kodierende Gen ilvD (Sahm und Eggeling (1999) Applied and Environmental Microbiology 65: 1973-1979),

25    • das für das Zwal-Protein kodierende Gen zwal (DE: 19959328.0, DSM 13115)

verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

Weiterhin kann es für die Produktion von L-Aminosäuren vorteilhaft sein, zusätzlich zur Verstärkung des sigM-Gens eines oder mehrere Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen pck (DE 199 50 409.1; DSM 13047),
- das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase kodierende Gen pgi (US 09/396,478; DSM 12969),
- das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen poxB (DE: 1995 1975.7; DSM 13114),
- 10 • das für das Zwa2-Protein kodierende Gen zwa2 (DE: 19959327.2, DSM 13113)

abzuschwächen, insbesondere die Expression zu verringern.

Der Begriff „Abschwächung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Verringerung oder Ausschaltung der 15 intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme (Proteine) in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise einen schwachen Promotor verwendet oder ein Gen bzw. Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer 20 niedrigen Aktivität kodiert bzw. das entsprechende Gen oder Enzym (Protein) inaktiviert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Durch die Maßnahmen der Abschwächung wird die Aktivität oder Konzentration des entsprechenden Proteins im 25 allgemeinen auf 0 bis 75%, 0 bis 50%, 0 bis 25%, 0 bis 10% oder 0 bis 5% der Aktivität oder Konzentration des Wildtyp-Proteins, beziehungsweise der Aktivität oder Konzentration des Proteins im Ausgangs-Mikroorganismus, herabgesenkt.

Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren 30 vorteilhaft sein, neben der Überexpression des sigM-Gens unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama:

"Breeding of Amino Acid Producing Micro-organisms", in: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen sind  
5 ebenfalls Gegenstand der Erfindung und können  
kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch - Verfahren  
(Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder  
repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren)  
zum Zwecke der Produktion von Aminosäuren kultiviert  
10 werden. Eine Zusammenfassung über bekannte  
Kultivierungsmethoden ist im Lehrbuch von Chmiel  
(Bioprozeßtechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik  
(Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch  
von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen  
15 (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den  
Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen  
von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im  
Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der  
20 American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA,  
1981) enthalten.

Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie  
z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose,  
Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette wie z.B.  
25 Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnußöl und Kokosfett, Fettsäuren  
wie z.B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure,  
Alkohole wie z.B. Glycerin und Ethanol und organische  
Säuren wie z.B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe  
können einzeln oder als Mischung verwendet werden.  
30 Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff-haltige  
Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt,  
Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff  
oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat,  
Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und

Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die

5 entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wuchsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben  
10 genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

15 Zur pH-Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw. Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie  
20 z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe wie z.B. Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoff  
25 haltige Gasmischungen wie z.B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum des gewünschten Produktes gebildet hat. Dieses Ziel wird  
30 normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

Methoden zur Bestimmung von L-Aminosäuren sind aus dem Stand der Technik bekannt. Die Analyse kann zum Beispiel so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 35 1190) beschrieben durch Ionenaustausch-Chromatographie mit

anschließender Ninhydrin-Derivatisierung erfolgen, oder sie kann durch reversed phase HPLC erfolgen, so wie bei Lindroth et al. (Analytical Chemistry (1979) 51: 1167-1174) beschrieben.

5 Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren.

Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

10 Folgender Mikroorganismus wurde als Reinkultur am 18. Juli 2001 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) gemäß Budapester Vertrag hinterlegt:

- *Escherichia coli* DH5amcr/pEC-XK99EsigMalex als DSM 14409

15 Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli* sowie alle Techniken zur Restriktion, Klenow- und alkalische Phosphatasebehandlung wurden nach Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA) durchgeführt. Methoden zur Transformation von *Escherichia* 20 *coli* sind ebenfalls in diesem Handbuch beschrieben.

Die Zusammensetzung gängiger Nährmedien wie LB- oder TY-Medium kann ebenfalls dem Handbuch von Sambrook et al. entnommen werden.

#### Beispiel 1

25 Herstellung einer genomischen Cosmid-Genbank aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032

Chromosomal DNA aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 wurde wie bei Tauch et al. (1995, Plasmid 33:168-179) beschrieben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI 30 (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Code no. 27-0913-02) partiell

gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Code no. 1758250) dephosphoryliert. Die DNA des Cosmid-Vektors SuperCos1 (Wahl et al. (1987) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 84:2160-2164), bezogen von der Firma Stratagene (La Jolla, USA, Produktbeschreibung SuperCos1 Cosmid Vektor Kit, Code no. 251301) wurde mit dem Restriktionsenzym XbaI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung XbaI, Code no. 27-0948-02) gespalten und ebenfalls mit shrimp alkalischer Phosphatase dephosphoryliert.

10 Anschließend wurde die Cosmid-DNA mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Code no. 27-0868-04) gespalten. Die auf diese Weise behandelte Cosmid-DNA wurde mit der behandelten ATCC13032-DNA gemischt und der Ansatz mit T4-DNA-Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no. 27-0870-04) behandelt. Das Ligationsgemisch wurde anschließend mit Hilfe des Gigapack II XL Packing Extracts (Stratagene, La Jolla, USA, Produktbeschreibung Gigapack II XL Packing Extract, Code no. 200217) in Phagen verpackt.

15 Zur Infektion des *E. coli* Stammes NM554 (Raleigh et al. 1988, Nucleic Acid Research 16:1563-1575) wurden die Zellen in 10 mM MgSO<sub>4</sub> aufgenommen und mit einem Aliquot der Phagensuspension vermischt. Infektion und Titerung der Cosmidbank wurden wie bei Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei die Zellen auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 100 mg/l Ampicillin ausplattiert wurden. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden rekombinante Einzelklone selektiert.

Beispiel 2

## Isolierung und Sequenzierung des sigM-Gens

Die Cosmid-DNA einer Einzelkolonie wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Product No. 27106, Qiagen, Hilden, 5 Germany) nach Herstellerangaben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Product No. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, 10 Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Product No. 1758250) dephosphoryliert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgte die Isolierung der Cosmidfragmente im Größenbereich von 1500 bis 2000 bp mit dem QiaExII Gel Extraction Kit (Product No. 20021, Qiagen, Hilden, 15 Germany).

Die DNA des Sequenziervektors pZero-1, bezogen von der Firma Invitrogen (Groningen, Niederlande, Produktbeschreibung Zero Background Cloning Kit, Product No. K2500-01), wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, 20 Produktbeschreibung BamHI, Product No. 27-0868-04) gespalten. Die Ligation der Cosmidfragmente in den Sequenziervektor pZero-1 wurde wie von Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring 25 Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei das DNA-Gemisch mit T4-Ligase (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) über Nacht inkubiert wurde. Dieses Ligationsgemisch wurde anschließend in den *E. coli* Stamm DH5 $\alpha$ MCR (Grant, 1990, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 30 87:4645-4649) elektroporiert (Tauch et al. 1994, FEMS Microbiol Letters, 123:343-7) und auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 50 mg/l Zeocin ausplattiert.

Die Plasmidpräparation der rekombinanten Klone erfolgte mit dem Biorobot 9600 (Product No. 900200, Qiagen, Hilden,

Deutschland). Die Sequenzierung erfolgte nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 74:5463-5467) mit Modifikationen nach Zimmermann et al. (1990, Nucleic Acids Research, 18:1067). Es wurde der "RR dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Kit" von PE Applied Biosystems (Product No. 403044, Weiterstadt, Deutschland) verwendet. Die gelelektrophoretische Auftrennung und Analyse der Sequenzierreaktion erfolgte in einem "Rotiphorese NF Acrylamid/Bisacrylamid" Gel (29:1) (Product No. A124.1, Roth, Karlsruhe, Germany) mit dem "ABI Prism 377" Sequenziergerät von PE Applied Biosystems (Weiterstadt, Deutschland).

Die erhaltenen Roh-Sequenzdaten wurden anschließend unter Anwendung des Staden-Programmpakets (1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) Version 97-0 prozessiert. Die Einzelsequenzen der pZero1-Derivate wurden zu einem zusammenhängenden Contig assembliert. Die computergestützte Kodierbereichsanalyse wurde mit dem Programm XNIP (Staden, 1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) angefertigt.

Die erhaltene Nukleotidsequenz ist in SEQ ID No. 1 dargestellt. Die Analyse der Nukleotidsequenz ergab ein offenes Leseraster von 675 Basenpaaren, welches als sigM-Gen bezeichnet wurde. Das sigM-Gen kodiert für ein Protein von 224 Aminosäuren.

### Beispiel 3

#### 3.1 Klonierung des sigM-Gens

Aus dem Stamm ATCC 13032 nach der Methode von Eikmanns et al. (Microbiology 140: 1817-1828 (1994)) chromosomal DNA isoliert. Aufgrund der aus Beispiel 2 für *C. glutamicum* bekannten Sequenz des sigM-Gens wurden die folgenden Oligonukleotide für die Polymerase Kettenreaktion ausgewählt (siehe SEQ ID No. 3 und SEQ ID No. 4):

sigMex1:

5` ga tctaga tat gta gca cct cag cga ca 3`

sigMex2:

5` ct ctgcag ctt cca tca gtt gct ttc gc 3`

5 Die dargestellten Primer wurden von der Firma MWG-Biotech AG (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert und nach der Standard-PCR-Methode von Innis et al. (PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, 1990, Academic Press) mit Pwo-Polymerase der Firma Roche Diagnostics GmbH

10 (Mannheim, Deutschland) die PCR Reaktion durchgeführt. Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion ermöglichen die Primer die Amplifikation eines 743 bp großen DNA-Fragmentes, welches das sigM-Gen trägt. Außerdem enthält der Primer sigMex1 die Sequenz für die Schnittstelle der

15 Restriktionsendonuklease XbaI, und der Primer sigMex2 die Schnittstelle der Restriktionsendonuklease PstI, die in der oben dargestellten Nukleotidabfolge durch Unterstrichen markiert sind.

Das 743 bp große sigM-Fragment wurde mit den

20 Restriktionsendonukleasen XbaI und PstI gespalten und anschließend aus dem Agarosegel mit dem QiaExII Gel Extraction Kit (Product No. 20021, Qiagen, Hilden, Germany) isoliert.

### 3.2 Konstruktion des Shuttle - Vektors pEC-XK99E

25 Nach dem Stand der Technik wurde der E. coli - C. glutamicum Shuttle - Vektor pEC-XK99E konstruiert. Der Vektor enthält die Replikationsregion rep des Plasmids pGA1 einschließlich des Replikationseffectors per (US-A-5,175,108; Nesvera et al., Journal of Bacteriology 179, 1525-1532 (1997)), das Kanamycin-Resistenzgen aph(3')-IIa aus Escherichia coli (Beck et al. (1982), Gene 19: 327-336), den Replikationsursprung, den trc-Promotor, die Terminationsregionen T1 und T2, das lacI<sup>q</sup>-Gen (Repressor des lac-Operons von E.coli) und eine

Mehrfachklonierschnittstelle (multiple cloning site, mcs) (Norlander, J.M. et al. Gene 26, 101-106 (1983)) des Plasmids pTRC99A (Amann et al. (1988), Gene 69: 301-315). Der trc-Promotor kann durch Zugabe des Lactose-Derivates 5 IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid) induziert werden.

Der konstruierte E. coli - C. glutamicum Shuttle - Vektor pEC-XK99E wurde mittels Elektroporation (Liebl et al., 1989, FEMS Microbiology Letters, 53:299-303) in C. glutamicum DSM5715 transferiert. Die Selektion der

10 Transformanten erfolgte auf LBHIS Agar bestehend aus 18,5 g/l Brain-Heart Infusion Boullion, 0,5 M Sorbitol, 5 g/l Bacto-Trypton, 2,5 g/l Bacto-Yeast-Extract, 5 g/l NaCl und 18 g/l Bacto-Agar, der mit 25 mg/l Kanamycin supplementiert worden war. Die Inkubation erfolgte für 2 Tage bei 33°C.

15 Plasmid DNA wurde aus einer Transformante nach den üblichen Methoden isoliert (Peters-Wendisch et al., 1998, Microbiology, 144, 915 - 927), mit der Restriktionsendonuklease HindIII geschnitten und das Plasmid durch anschließende Agarosegel-Elektrophorese 20 überprüft.

Das so erhaltene Plasmidkonstrukt wurde als pEC-XK99E (Figur 1) bezeichnet. Der durch Elektroporation des Plasmides pEC-XK99E in den C. glutamicum-Stamm DSM5715 erhaltene Stamm wurde DSM5715/pEC-XK99E genannt und als 25 DSM13455 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) gemäß Budapest Vertrag hinterlegt.

### 3.3 Klonierung von sigM in den E. coli-C. glutamicum Shuttle Vektor pEC-XK99E

30 Als Vektor wurde der in Beispiel 3.2 beschriebene E. coli - C. glutamicum Shuttle-Vektor pEC-XK99E verwendet. DNA dieses Plasmids wurde mit den Restriktionsenzymen XbaI und PstI vollständig gespalten und anschließend mit shrimp

alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Product No. 1758250) dephosphoryliert.

Das in Beispiel 3.1 beschriebene, mittels PCR gewonnene und  
5 mit den Restriktionsenonukleasen XbaI und PstI gespaltene  
ca. 741 bp große sigM-Fragment wurde mit dem vorbereiteten  
Vektor pEC-XK99E gemischt und der Ansatz mit T4-DNA-Ligase  
(Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland,  
Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no.27-0870-04)  
10 behandelt. Der Ligationsansatz wurde in den E. coli Stamm  
DH5 $\alpha$ mcr (Hanahan, In: DNA cloning. A Practical Approach.  
Vol. I. IRL-Press, Oxford, Washington DC, USA)  
transformiert. Die Selektion von Plasmid-tragenden Zellen  
erfolgte durch Ausplattieren des Transformationsansatzes  
15 auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 50 mg/l  
Kanamycin. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden  
rekombinante Einzelklone selektiert. Plasmid DNA wurde  
aus einer Transformante mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit  
(Product No. 27106, Qiagen, Hilden, Germany) nach  
20 Herstellerangaben isoliert und mit den Restriktionsenzymen  
XbaI und PstI gespalten, um das Plasmid durch anschließende  
Agarosegel-Elektrophorese zu überprüfen. Das erhaltene  
Plasmid wurde pEC-XK99EsigMalex genannt. Es ist in Figur 2  
dargestellt.

25 Beispiel 4

Transformation des Stammes DSM5715 mit dem Plasmid  
pEC-XK99EsigMalex

Der Stamm DSM5715 wurde mit dem Plasmid pEC-XK99EsigMalex  
unter Anwendung der von Liebl et al., (FEMS Microbiology  
30 Letters, 53:299-303 (1989)) beschriebenen  
Elektroporationsmethode transformiert. Die Selektion der  
Transformanten erfolgte auf LBHIS Agar bestehend aus 18,5  
g/l Brain-Heart Infusion Boullion, 0,5 M Sorbitol, 5 g/l  
Bacto-Trypton, 2,5 g/l Bacto-Yeast-Extract, 5 g/l NaCl und

18 g/l Bacto-Agar, der mit 25 mg/l Kanamycin supplementiert worden war. Die Inkubation erfolgte für 2 Tage bei 33°C.

Plasmid DNA wurde aus einer Transformante nach den üblichen Methoden isoliert (Peters-Wendisch et al., 1998,

5 Microbiology, 144, 915 – 927), mit den Restriktionsendonukleasen XbaI und PstI geschnitten und das Plasmid durch anschließende Agarosegel-Elektrophorese überprüft. Der erhaltene Stamm wurde DSM5715/pEC-XK99EsigMalex genannt.

10 Beispiel 5

Herstellung von Lysin

Der in Beispiel 4 erhaltene C. glutamicum Stamm DSM5715/pEC-XK99EsigMalex wurde in einem zur Produktion von Lysin geeigneten Nährmedium kultiviert und der Lysingehalt 15 im Kulturüberstand bestimmt.

Dazu wurde der Stamm zunächst auf Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum (Hirn-Herz-Agar mit Kanamycin (25 mg/l)) für 24 Stunden bei 33°C inkubiert. Ausgehend von dieser Agarplattenkultur wurde eine Vorkultur angeimpft (10 20 ml Medium im 100 ml Erlenmeyerkolben). Als Medium für die Vorkultur wurde das Vollmedium CgIII verwendet.

Medium Cg III

NaCl 2,5 g/l

Bacto-Pepton 10 g/l

Bacto-Yeast-Extrakt 10 g/l

Glucose (getrennt autoklaviert) 2% (w/v)

Der pH-Wert wurde auf pH 7.4 eingestellt

Diesem wurde Kanamycin (25 mg/l) zugesetzt. Die Vorkultur wurde 16 Stunden bei 33°C bei 240 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Von dieser Vorkultur wurde eine Hauptkultur angeimpft, so daß die Anfangs-OD (660 nm) der Hauptkultur 5 0,1 betrug. Für die Hauptkultur wurde das Medium MM verwendet.

## Medium MM

CSL (Corn Steep Liquor) 5 g/l

MOPS (Morpholinopropansulfonsäure) 20 g/l

Glucose (getrennt autoklaviert) 50 g/l

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  25 g/l

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 g/l

$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$  1,0 g/l

$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$  10 mg/l

$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$  10 mg/l

$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  5,0mg/l

Biotin (sterilfiltriert) 0,3 mg/l

Thiamin \* HCl (sterilfiltriert) 0,2 mg/l

L-Leucin (sterilfiltriert) 0,1 g/l

$\text{CaCO}_3$  25 g/l

CSL, MOPS und die Salzlösung wurden mit Ammoniakwasser auf pH 7 eingestellt und autoklaviert. Anschließend wurden die 10 sterilen Substrat- und Vitaminlösungen zugesetzt, sowie das trocken autoklavierte  $\text{CaCO}_3$ .

Die Kultivierung erfolgt in 10 ml Volumen in einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen. Es wurde Kanamycin (25 mg/l) und IPTG (1mM/l) zugesetzt. Die Kultivierung erfolgte bei 33°C und 80% Luftfeuchte.

5 Nach 72 Stunden wurde die OD bei einer Messwellenlänge von 660 nm mit dem Biomek 1000 (Beckmann Instruments GmbH, München) ermittelt. Die gebildete Lysinmenge wurde mit einem Aminosäureanalysator der Firma Eppendorf-BioTronik (Hamburg, Deutschland) durch Ionenaustauschchromatographie 10 und Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrindetektion bestimmt.

In Tabelle 1 ist das Ergebnis des Versuchs dargestellt.

Tabelle 1

Stamm	OD (660 nm)	Lysin-HCl g/l
DSM5715	11,8	14,43
DSM5715/ pEC-XK99EsigMalex	9,0	14,82

15 Kurze Beschreibung der Figuren:

Figur 1: Karte des Plasmids pEC-XK99E

Figur 2: Karte des Plasmids pEC-XK99EsigMalex

Die verwendeten Abkürzungen und Bezeichnungen haben folgende Bedeutung:

Kan: Kanamycin Resistenz-Gen *aph(3')-IIa* aus *Escherichia coli*

HindIII Schnittstelle des Restriktionsenzyms HindIII

XbaI Schnittstelle des Restriktionsenzyms XbaI

PstI	Schnittstelle des Restriktionsenzyms PstI
Ptrc	trc-Promotor
T1	Terminationsregion T1
T2	Terminationsregion T2
per	Replikationseffektor per
rep	Replikationregion rep des Plasmides pGAl
lacIq	lacIq-Repressor des lac-Operons von Escherichia coli
sigM	kloniertes sigM-Gen

## SEQUENZPROTOKOLL

&lt;110&gt; Degussa AG

5 &lt;120&gt; Für das sigM-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

&lt;130&gt; 000449 BT

&lt;140&gt;

10 &lt;141&gt;

&lt;160&gt; 4

15 &lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1211

&lt;212&gt; DNA

20 &lt;213&gt; Corynebacterium glutamicum

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (236)..(907)

25 &lt;223&gt; sigM-Gen

&lt;400&gt; 1

gacaccaatc cacagatgca gatcgctgaa gtacaacttg ttgggtggta aattacgcgt 60

30 ttgtgattga ccccccattaa ggtgcgcccc ccctcagttt cactaactga aggcggcggt 120

ttttaattta tatatacgctt cagctcacag gtatttcca gaaagaagag ccctcaaagt 180

atgttagcacc tcagcgacac ctccccacttg agtggcgcc gagaagtatc tctca atg 238  
Met  
135 gaa aat ctg ccc ata cta agc cgc ata agg gat acg ggg tgt gtc cct 286  
Glu Asn Leu Pro Ile Leu Ser Arg Ile Arg Asp Thr Gly Cys Val Pro  
5 10 1540 caa cct gcg ggg gat ctt atg aca gta ctg cct aaa aac cat gac cta 334  
Gln Pro Ala Gly Asp Leu Met Thr Val Leu Pro Lys Asn His Asp Leu  
20 25 3045 agc gat acc caa ctc gtc aaa cag ttt ata tct ggc gac tcc agg gca 382  
Ser Asp Thr Gln Leu Val Lys Gln Phe Ile Ser Gly Asp Ser Arg Ala  
35 40 4550 ttt tcc acc atc att cac cgc cac gaa cga cat atg atg cag gca gcc 430  
Phe Ser Thr Ile Ile His Arg His Glu Arg His Met Met Gln Ala Ala  
50 55 60 6555 aga aaa tac ggg cgg aaa cca gaa gac gcc caa gac att ctc caa gaa 478  
Arg Lys Tyr Gly Arg Lys Pro Glu Asp Ala Gln Asp Ile Leu Gln Glu  
70 75 80gct ctc ttt cgc gcc agc cga aac atg cac ctt tat aga gca gaa gca 526  
Ala Leu Phe Arg Ala Ser Arg Asn Met His Leu Tyr Arg Ala Glu Ala  
85 90 95

5	gct ctc ggc acg tgg ctc cac aaa ctt gtc ctg aat agc ggc ttc gat Ala Leu Gly Thr Trp Leu His Lys Leu Val Leu Asn Ser Gly Phe Asp 100 105 110	574
10	tgg gct acc cac cgc tcc caa gta gaa ttc ccc atc ctt aac gaa cca Trp Ala Thr His Arg Ser Gln Val Glu Phe Pro Ile Leu Asn Glu Pro 115 120 125	622
15	aca atc gat tta gaa aaa gat cct cgc cta gcc acc gac ccc ttg ggc Thr Ile Asp Leu Glu Lys Asp Pro Arg Leu Ala Thr Asp Pro Leu Gly 130 135 140 145	670
20	tac ctc gat gtc gcc atg aca att cga tcc gcc atc gac caa tta cac Tyr Leu Asp Val Ala Met Thr Ile Arg Ser Ala Ile Asp Gln Leu His 150 155 160	718
25	ccc gat caa cgc atc gcc tta ata ctt gtc gac ctc ggc ggc tac acc Pro Asp Gln Arg Ile Ala Leu Ile Leu Val Asp Leu Gly Gly Tyr Thr 165 170 175	766
30	gta gaa gat gtg gcc gaa atc gaa gga atc aaa gta ggt acc gtt aaa Val Glu Asp Val Ala Glu Ile Glu Gly Ile Lys Val Gly Thr Val Lys 180 185 190	814
35	tca cgc cga ggg cgc gca cgc aaa gcg ttg cgc gcc ctt tta cat gca Ser Arg Arg Gly Arg Ala Arg Lys Ala Leu Arg Ala Leu Leu His Ala 195 200 205	862
40	gat ttc ttc ggg ccc gaa gat ggc tcc ata cag tgc gaa agc aac Asp Phe Phe Gly Pro Glu Asp Gly Ser Ile Gln Cys Glu Ser Asn 210 215 220	907
45	tgatggaagt ttttcaaagt gtctgacgtt gaaaacggtg agttcacaac tagggtaat ggtgacgtg atgctgcact ttacgttta ctactttgag gaaaacaatg tctgaagaac aatctgccgt agcaccaaag attcatgatg tcgccatcat cggctccggc ccagctggct atacggtgg atctttgatg accactactg acgtggaaaa cttcccaggc tttgaaaagg gaat	967 1027 1087 1147 1207 1211
50	<210> 2 <211> 224 <212> PRT <213> Corynebacterium glutamicum	
55	<400> 2 Met Glu Asn Leu Pro Ile Leu Ser Arg Ile Arg Asp Thr Gly Cys Val 1 5 10 15 Pro Gln Pro Ala Gly Asp Leu Met Thr Val Leu Pro Lys Asn His Asp 20 25 30	

Leu Ser Asp Thr Gln Leu Val Lys Gln Phe Ile Ser Gly Asp Ser Arg  
 35 40 45

Ala Phe Ser Thr Ile Ile His Arg His Glu Arg His Met Met Gln Ala  
 5 50 55 60

Ala Arg Lys Tyr Gly Arg Lys Pro Glu Asp Ala Gln Asp Ile Leu Gln  
 65 70 75 80

10 Glu Ala Leu Phe Arg Ala Ser Arg Asn Met His Leu Tyr Arg Ala Glu  
 85 90 95

Ala Ala Leu Gly Thr Trp Leu His Lys Leu Val Leu Asn Ser Gly Phe  
 100 105 110

15 Asp Trp Ala Thr His Arg Ser Gln Val Glu Phe Pro Ile Leu Asn Glu  
 115 120 125

20 Pro Thr Ile Asp Leu Glu Lys Asp Pro Arg Leu Ala Thr Asp Pro Leu  
 130 135 140

Gly Tyr Leu Asp Val Ala Met Thr Ile Arg Ser Ala Ile Asp Gln Leu  
 145 150 155 160

25 His Pro Asp Gln Arg Ile Ala Leu Ile Leu Val Asp Leu Gly Gly Tyr  
 165 170 175

Thr Val Glu Asp Val Ala Glu Ile Glu Gly Ile Lys Val Gly Thr Val  
 180 185 190

30 Lys Ser Arg Arg Gly Arg Ala Arg Lys Ala Leu Arg Ala Leu Leu His  
 195 200 205

35 Ala Asp Phe Phe Gly Pro Glu Asp Gly Ser Ile Gln Cys Glu Ser Asn  
 210 215 220

40 <210> 3  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

45 <220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer  
 sigMex1

50 <400> 3  
 caggtacctg gctacgagga cgattaag 28

55 <210> 4  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer  
 sigMex2

&lt;400&gt; 4

tgtctagaaa gcatgcggag gaatcaac

28

5

**Patentansprüche**

1. Isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine für das sigM-Gen kodierende Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

5 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,

10 b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,

c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und

15 d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),

wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität des Sigma-Faktors M aufweist.

20 2. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid eine in coryneformen Bakterien replizierbare, bevorzugt rekombinante DNA ist.

3. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid eine RNA ist.

25 4. Polynukleotid gemäß Anspruch 2, enthaltend die Nukleinsäuresequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt.

5. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 2, enthaltend

(i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1, oder

- (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Kodes entspricht, oder
- 5 (iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert, und gegebenenfalls
  - (iv) funktionsneutrale Sinnmutationen in (i).
- 10 6. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 5, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß die Hybridisierung von Sequenz (iii) unter einer Stringenz entsprechend höchstens 2x SSC durchgeführt wird.
- 7. Polynukleotidsequenz gemäß Anspruch 2, die für ein Polypeptid kodiert, das die in SEQ ID No. 2 dargestellte Aminosäuresequenz enthält.
- 15 8. Coryneforme Bakterien, in denen das sigM-Gen verstärkt, insbesondere überexprimiert wird.
- 9. Escherichia coli Stamm DH5amcr/pEC-XK99EsigMalex als DSM 14409 hinterlegt bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, 20 Deutschland.
- 10. Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere Lysin, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man folgende Schritte durchführt:
  - 25 a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure produzierenden coryneformen Bakterien, in denen man zumindest das endogene sigM-Gen oder dafür kodierende Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere überexprimiert;
  - 30 b) Anreicherung der L-Aminosäure im Medium oder in den Zellen der Bakterien, und

## c) Isolierung der L-Aminosäure.

11. Verfahren gemäß Anspruch 10, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, daß man Bakterien  
einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des  
5 Biosyntheseweges der gewünschten L-Aminosäure  
verstärkt.

12. Verfahren gemäß Anspruch 10, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, daß man Bakterien  
einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest  
10 teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung der  
gewünschten L-Aminosäure verringern.

13. Verfahren gemäß Anspruch 10, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, daß man einen mit einem  
Plasmidvektor transformierten Stamm einsetzt, und der  
15 Plasmidvektor die für das sigM-Gen kodierende  
Nukleotidsequenz trägt.

14. Verfahren gemäß Anspruch 10, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, daß man die Expression des  
(der) Polynukleotids (e), das (die) für das sigM-Gen  
20 kodiert (kodieren) verstärkt, insbesondere  
überexprimiert.

15. Verfahren gemäß Anspruch 10, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, daß man die  
regulatorischen Eigenschaften des Polypeptids  
25 (Enzymprotein) erhöht, für das das Polynukleotid sigM  
kodiert.

16. Verfahren gemäß Anspruch 10, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, daß man zur Herstellung  
von L-Aminosäuren coryneforme Mikroorganismen  
30 fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder  
mehrere der endogenen Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- 16.1 das für die Dihydrodipicolinat-Synthase kodierende Gen dapA,
- 16.2 das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase kodierende Gen gap,
- 5 16.3 das für die Triosephosphat Isomerase kodierende Gen tpi,
- 16.4 das für die 3-Phosphoglycerat Kinase kodierende Gen pgk,
- 16.5 das für die Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase kodierende Gen zwf,
- 10 16.6 das für die Pyruvat Carboxylase kodierende Gen pyc,
- 16.7 das für die Malat-Chinon-Oxidoreduktase kodierende Gen mqo,
- 15 16.8 das für eine feed-back resistente Aspartatkinase kodierende Gen lysC,
- 16.9 das für den Lysin-Export kodierende Gen lysE,
- 16.10 das für die Homoserin-Dehydrogenase kodierende Gen hom,
- 20 16.11 das für die Threonin-Dehydratase kodierende Gen ilvA oder das für eine feed back resistente Threonin-Dehydratase kodierende Allel ilvA(Fbr),
- 16.12 das für die Acetohydroxysäure-Synthase kodierende Gen ilvBN,
- 25 16.13 das für die Dihydroxysäuredehydratase kodierende Gen ilvD,
- 16.14 das für das Zwal-Protein kodierende Gen zwal,

verstärkt bzw. überexprimiert.

17. Verfahren gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Herstellung von L-Aminosäuren coryneforme Mikroorganismen fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

17.1 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen *pck*,

17.2 das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase kodierende Gen *pgi*,

17.3 das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen *poxB*,

17.4 das für das Zwa2-Protein kodierende Gen *zwa2*, abschwächt.

15 18. Coryneforme Bakterien, die einen Vektor enthalten, der ein Polynukleotid gemäß Anspruch 1 trägt.

19. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 10-17, dadurch gekennzeichnet, daß man Mikroorganismen der Gattung *Corynebacterium* einsetzt.

20. Verfahren gemäß Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß man den *Corynebacterium glutamicum* Stamm DSM5715/pEC-XK99EsigMalex einsetzt.

25 21. Verfahren zum Auffinden von RNA, cDNA und DNA, um Nukleinsäuren, beziehungsweise Polynukleotide oder Gene zu isolieren, die für den Sigma-Faktor M kodieren oder eine hohe Ähnlichkeit mit der Sequenz des *sigM*-Gens aufweisen, dadurch gekennzeichnet, daß man das Polynukleotid, enthaltend die

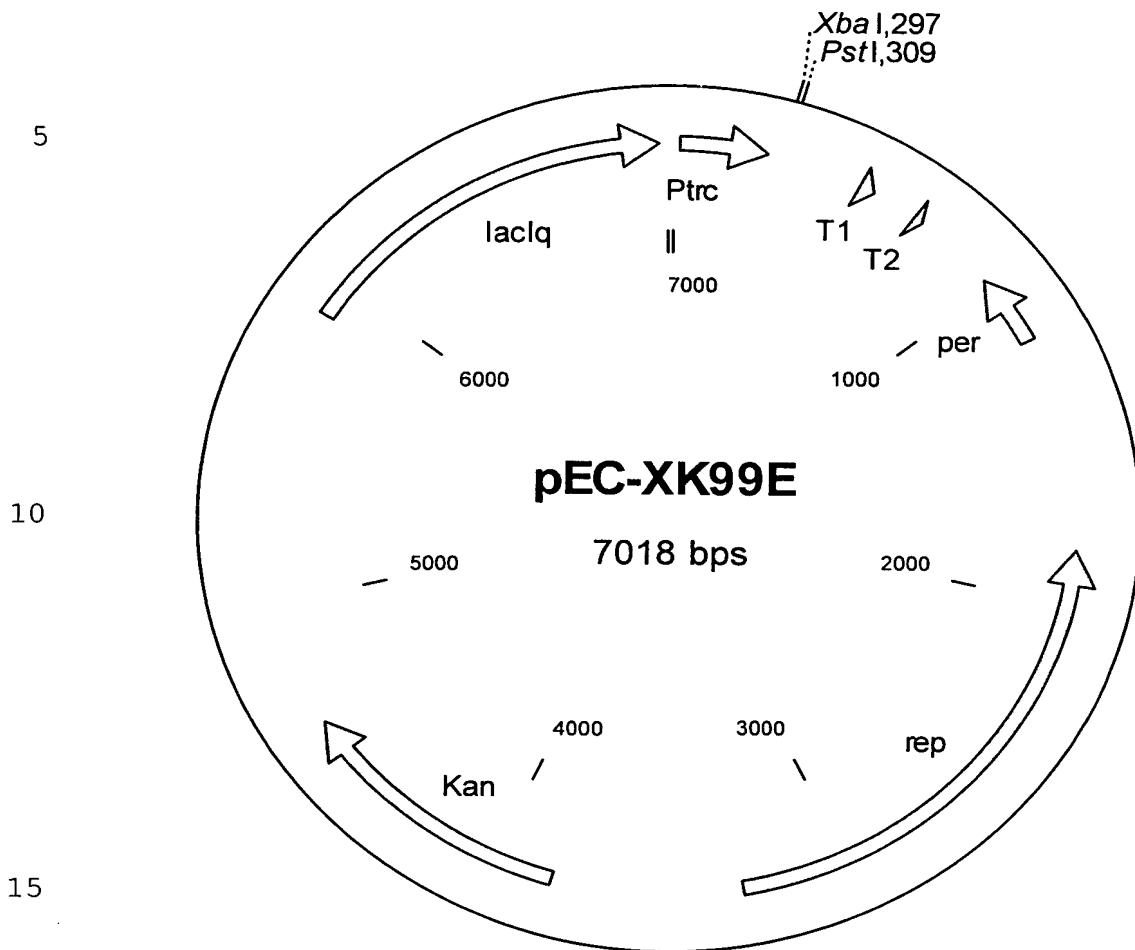
**Zusammenfassung**

Die Erfindung betrifft ein isoliertes Polynukleotid, enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

- 5    a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- 10    b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
- 15    c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
- d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),

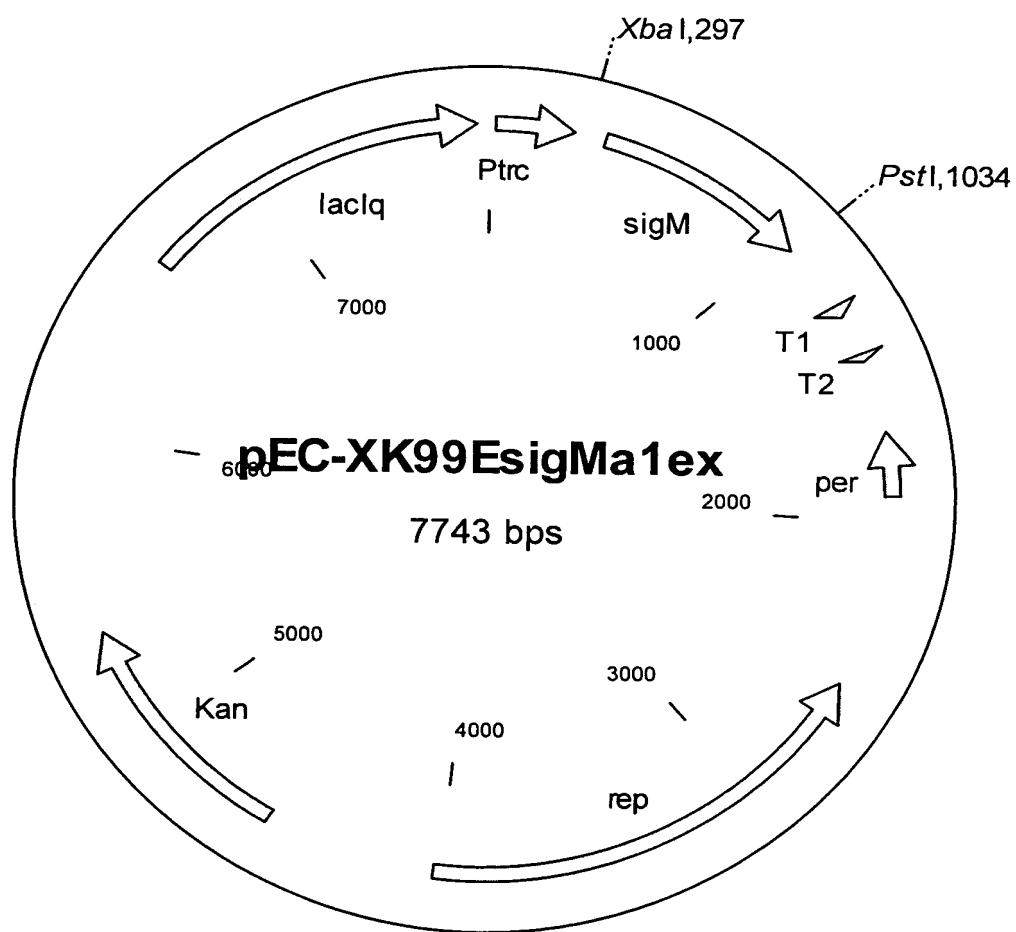
20 und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren unter Verwendung von coryneformen Bakterien, in denen zumindest das sigM-Gen verstärkt vorliegt, und die Verwendung von Polynukleotiden, die die erfindungsgemäßen Sequenzen enthalten, als Hybridisierungssonden.

Figur 1: Karte des Plasmides pEC-XK99E



Figur 2: Karte des Plasmides pEC-XK99EsigMalex

5





Creation date: 09-05-2003

Indexing Officer: TKASSAYE - TILAHUN KASSAYE

Team: OIPEBackFileIndexing

Dossier: 09942935

Legal Date: 12-10-2001

No.	Doccode	Number of pages
1	LET.	7
2	CRFL	1
3	A...	1
4	REM	1
5	OATH	2
6	SEQLIST	4

Total number of pages: 16

Remarks:

Order of re-scan issued on .....